

FavorPrep™ Endotoxin Free Plasmid Extraction Mini Kit

Cat: FSPD302-004 (4 回分) / FSPD302-100 (100 回分)

本製品は研究用です

ver. 202405

📌 キットの内容

	FSPD302-004 (4 preps)	FSPD302-100 (100 preps)
PM1 Buffer	1 ml	25 ml
PM2 Buffer	1 ml	25 ml
PM3 Buffer	1 ml	25 ml
FAER Buffer	1 ml	25 ml
WP Buffer	6 ml	135 ml
Wash Buffer (Concentrate) *	1 ml	20 ml
Elution Buffer	0.5 ml	15 ml
RNase A Solution **	10 µl	75 µl
FAPD Mini Columns	4 pcs	50 pcs × 2
Collection Tubes	4 pcs	100 pcs
Elution Tubes	4 pcs × 2	100 pcs × 2
PM1 Buffer と Wash Buffer の調製		
PM1 Buffer に添加する RNase A Solution 量**	2 µl	50 µl
Wash Buffer に添加するエタノール量*	4 ml	80 ml

📌 基本情報

構成	スピнкаラム(シリカメンブレン)
結合量	≤60 µg DNA/column
所要時間	<30 分
サンプル量	1-5 ml (バクテリア) for high-copy number or low-copy number plasmid
プラスミドサイズ	<150 kbp
最小溶出量	50 µl

Well-grown bacterial culture

Centrifuge
1,100 xg, 1 min



- Harvest bacterial cells.

Centrifuge
18,000 xg, 5 mins



- Resuspend (200 µl PM1 Buffer)
- Lyse (200 µl PM2 Buffer)
- Neutralize (200 µl PM3 Buffer)

Centrifuge
18,000 xg, 5 mins



- Clarify the lysate by centrifuge.
- Transfer the supernatant.

Centrifuge
18,000 xg, 5 mins



- Add 200 µl FAER Buffer, vortex thoroughly.
- Incubation on ice for 5 mins.
- Centrifugation.
- Transfer the supernatant into an Elution Tube .

FAPD Mini Column

Centrifuge
18,000 xg, 1 min



- Add 650 µl WP Buffer, vortex thoroughly.
- Binding DNA.

Centrifuge
18,000 xg, 1 min



- Add 400 µl WP Buffer.
- Add 700 µl Wash Buffer (ethanol contained).

Centrifuge
18,000 xg, 3 mins



- Drying the column membrane.

Centrifuge
18,000 xg, 1 min



- Elution (50-100 µl Elution Buffer).
- Obtain purified endotoxin-free plasmid DNA.

重要事項

- 1) キットの構成は室温(15~25°C)で保存してください。ただし、RNase A Solution はお客様の手元に届き次第、-20°Cで保存してください。
- 2) PM1 Buffer に指示された量の RNase A Solution を加えてよく混和し、4°Cで保存してください。
- 3) Wash Buffer に指示された量のエタノール(96~100%)を加えてよく混和し、室温で保存してください。
- 4) PM2 Buffer に沈殿物が見られる場合、37°Cの湯せんで沈殿物が溶解するまで温めてください。
- 5) 遠心分離は 11,000~18,000 × gで行ってください。
- 6) 溶出ステップでは Elution Buffer を 65°Cに予熱してから使用してください。

操作 ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。

<バクテリア細胞の用意>

1. よく増殖させた細菌培養液 1~5ml を 11,000 × g で 1 分間遠心分離し、ペレット化する。上澄みを完全に捨てる。

<細胞の再懸濁・溶解・中和>

2. ペレットに 200 μl の PM1 Buffer (RNase A 添加) を加え、ボルテックスまたはピペティングでペレットが残らないように細胞を完全に懸濁させる。
3. 200 μl の PM2 Buffer を加え、5~10 回転倒混和させる。その後、室温で 3~5 分間インキュベートし、細胞を溶解する。
 - * ゲノム DNA が切断されるため、ボルテックスはしないでください。
 - * インキュベーションを 5 分以上継続しないでください。
4. 200 μl の PM3 Buffer を加え、直ちに 5~10 回転倒混和し、溶解液を完全に中和させる。
 - * 沈殿が局在化するのを防ぐため、PM3 Buffer 添加後は直ちに混和してください。

<ライセートの清澄化>

5. 18,000 × g で 5 分間遠心分離し、ライセートを清澄化する。白色沈殿を崩さないように注意しながら、上澄みを新しい 1.5ml 遠心チューブに移す。
 - * 白色沈殿を崩したり、遠心チューブに移したりしないでください。
 - * 上澄みが透明でない場合は、このステップを繰り返してください。

<エンドキシンの除去>

6. 200 μl の FAER Buffer を加え、10 秒間ボルテックスする。濁らせた混合液を氷上で 5 分間インキュベートし、その後 10 秒間ボルテックスする。
 - * FAER Buffer は粘性のある溶液ですので、ピペティングはゆっくり行ってください。
 - * 室温が 10°C 以下の場合は、氷冷後 65°C で 5 分間加熱してください。

7. 18,000 × g で 5 分間遠心分離する。底面にある赤い生成物を崩さないように注意しながら、透明な上澄みを Elution Tube に移す。

* 赤い生成物(エンドトキシンを含む)が混入した場合は、このステップを繰り返してください。

<プラスミドの結合>

8. 650 μl の WP Buffer を上澄みへ加え、完全に混和させる。
9. FAPD Mini Column を Collection Tube に取り付ける。注意しながら上澄みを移し、18,000 × g で 1 分間遠心分離する。その後、ろ液を捨てる。

<カラムの洗浄>

10. FAPD Mini Column に 400 μl の WP Buffer を加え、18,000 × g で 1 分間遠心分離する。その後、ろ液を捨てる。
11. FAPD Mini Column に 700 μl の Wash Buffer (エタノール添加) を加え、18,000 × g で 1 分間遠心分離する。その後、ろ液を捨てる。
12. 18,000 × g でさらに 3 分間遠心分離し、FAPD Mini Column を乾燥させる。

<溶出>

13. FAPD Mini Column を新しい Elution Tube に取り付ける。
14. FAPD Mini Column の膜中央に 50~100 μl の Elution Buffer またはエンドトキシンフリーの水(pH 7.5~9.0)を加え、1 分間静置する。
15. 18,000 × g で 1 分間遠心分離し、溶出したプラスミド DNA は-20°Cで保存する。